



(11) Veröffentlichungsnummer:

0 103 677
A1

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 83105453.1

(61) Int. Cl.³: C 12 Q 1/68

(22) Anmeldetag: 01.06.83

(30) Priorität: 02.06.82 DE 3220733
11.04.83 DE 3312929

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
28.03.84 Patentblatt 84/13

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE FR GB IT LI NL SE

(71) Anmelder: Gesellschaft für Biotechnologische
Forschung mbH (GBF)
Mascheroder Weg 1
D-3300 Braunschweig-Stöckheim(DE)

(72) Erfinder: Blöcker, Helmut, Dr.
Schinkelstrasse 6
D-2000 Hamburg 60(DE)

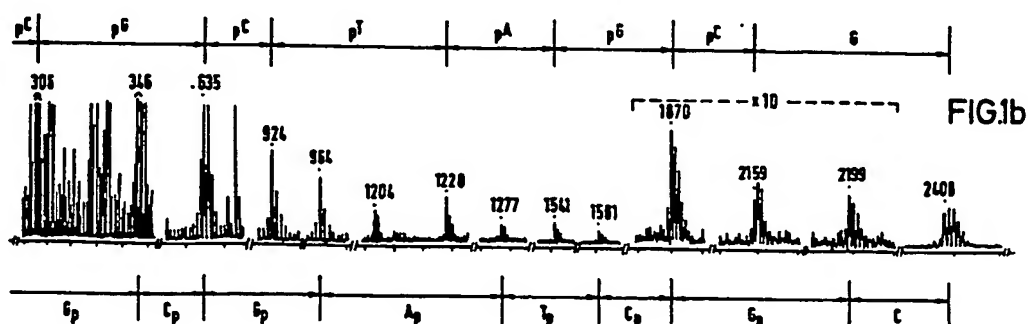
(72) Erfinder: Frank, Ronald, Dr.
Leibnizstrasse 8
D-3340 Wolfenbüttel(DE)

(72) Erfinder: Grotjahn, Lutz, Dr.
Bocksbergweg 7
D-3300 Braunschweig(DE)

(74) Vertreter: Boeters, Hans Dietrich, Dr. et al,
Boeters, Bauer & Partner Thomas-Wimmer-Ring 14
D-8000 München 22(DE)

(84) Verfahren zur Sequenzanalyse eines gegebenenfalls modifizierten Oligoribonukleotids oder Oligodesoxyribonukleotids.

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Sequenzanalyse eines gegebenenfalls modifizierten Oligoribonukleotids oder Oligodesoxyribonukleotids durch Massenspektrometrie.



EP 0 103 677 A1

BOETERS, BAUER & PARTNER

PATENTANWÄLTE
EUROPEAN PATENT ATTORNEYS

THOMAS-WIMMER-RING 14
D-8000 MÜNCHEN 22

0103677

PAa BOETERS, BAUER & PARTNER
THOMAS-WIMMER-RING 14, D-8000 MÜNCHEN 22

Europäisches Patentamt

8000 München 2

DIPLOM.-CHEM. DR. HANS D. BOETERS
DIPLOM.-ING. ROBERT BAUER
MÜNCHEN

DIPLOM.-ING. VINCENZ V. RAFFAY
DIPLOM.-CHEM. DR. THOMAS FLECK
HAMBURG

TELEFON (089) 22 78 87
TELEX 5 24 678 mm
TELEGRAMME: PROVENTION, MÜNCHEN

Anmelderin: Gesellschaft für Biotechnologische
Forschung mbH (GBF), Mascheroder Weg 1,
D-3300 Braunschweig-Stöckheim

Verfahren zur Sequenzanalyse eines gegebenenfalls modifi-
zierten Oligoribonukleotids oder Oligodesoxyribonukleotids

Synthetische Oligonukleotide werden für die modernen Bio-
wissenschaften immer wichtiger. Insbesondere hat die che-
mische Synthese von vorgegebenen Nukleotidsequenzen die
Entwicklung der Gentechnologie gefördert und beschleunigt.
Dadurch wurde die Entwicklung neuer und schnellerer Synthesemethoden angeregt, beispielsweise die Entwicklung von besseren Kupplungsmethoden (1, 2), von hochselektiven und milden Entschützungsmitteln (3, 4) und die Verwendung von geeigneten festen Trägern (5, 6, 7). Derartige Synthesen lassen sich heute in einigen Tagen durchführen; demgemäß ist die größere Arbeit bei der sorgfältigen Analyse der entschützten Oligonukleotide zu leisten. Sequenzanalysen werden üblicherweise durch chemische Abbaumethoden (8) oder "Wandering-Spot"-Methoden (9) nach radioaktiver Markierung durchgeführt.

Für vollgeschützte Oligonukleotide wurde ein relativ kom-

plexes Fragmentierungsverhalten auf Basis einer Negativionen-²⁵²Cf-Plasmadesorptionsmassenspektrometrie beschrieben (12). McNeal et al. geben ferner an, daß Oligonukleotide mit den natürlich auftretenden Phosphodiester-Internukleotidbindungen ein noch komplexeres Fragmentierungsverhalten zeigen und daß die Ausbeute an Molekülonen stark beeinträchtigt wird (12).

Entsprechend diesem Stand der Technik muß es überraschen, daß es erfindungsgemäß möglich ist, eine Sequenzanalyse von gegebenenfalls modifizierten Oligoribonukleotiden oder Oligodesoxyribonukleotiden durch Massenspektrometrie auf einfache Weise durchzuführen.

Dazu wird erfindungsgemäß ein Verfahren zur Sequenzanalyse eines gegebenenfalls modifizierten Oligoribonukleotids oder Oligodesoxyribonukleotids vorgeschlagen, daß dadurch gekennzeichnet ist, daß man

- (a) das gegebenenfalls modifizierte Nukleotid einer Massenspektrometrie unterwirft, wobei es sich bei dem modifizierten Nukleotid um ein Nukleotid mit mindestens einem ionischen Phosphatrest (Phosphatladung) oder um ein unter Meßbedingungen einen derartigen Phosphatrest lieferndes Nukleotid handelt,
- (b) die Negativionen registriert und
- (c1) die Massendifferenz zwischen gewichtsmäßig aufeinanderfolgenden 5'-P-Ionen und/oder
- (c2) die Massendifferenz zwischen gewichtsmäßig aufeinanderfolgenden 3'-P-Ionen ermittelt und
- (d) die ermittelten aufeinanderfolgenden Massendifferenzen den Basen zuordnet.

Beispiel für anwendbare massenspektrometrische Methoden sind die FAB-Massenspektrometrie und die SIMS-Massenspektrometrie oder Kombinationen dieser Methoden. Hinsichtlich

der FAB-Massenspektrometrie sei beispielsweise auf Barber et al. (10) und Morris et al. (13) hingewiesen. Ein wesentliches Merkmal der FAB-Massenspektrometrie besteht darin, daß das in Form einer Monolayer auf einer Matrix vorliegende zu untersuchende Material mit neutralen, ungeladenen Teilchen bombardiert wird, beispielsweise mit einem Edelgas in einem Feld von beispielsweise 5 kV oder mehr.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird also auf ungeschützte bzw. entschützte Oligoribonukleotide oder Oligodesoxyribonukleotide angewandt. Die Obergrenze der Basenanzahl von nach dem erfindungsgemäßen Verfahren zu analysierenden Nukleotiden ist nicht durch das Verfahrensprinzip begrenzt, in der Praxis kann jedoch eine Grenze durch das Auflösungsvermögen des verwendeten Massenspektrographen gesetzt werden.

Richtwerte für die Homogenität des zu sequenzierenden Materials sind 95, insbesondere 97 und vorzugsweise 99 %. Es muß jedoch dem Fachmann überlassen bleiben und kann ihm zugemutet werden, den geeigneten Homogenitätsgrad zu ermitteln. Es kann sich erweisen, daß von Fall zu Fall ein anderer Homogenitätsgrad wünschenswert ist, da manche Verunreinigungen überproportional im Spektrum vertreten sein können, wie nukleotidisches Material mit lipophilen Gruppen z.B. mit der Tritylgruppe.

Nachstehend wird die Erfindung anhand von Figuren näher erläutert. Es zeigen:

Fig. 1a ein Negativionen-FAB-Massenspektrum des Oligodesoxyribonukleotids a, nämlich d(A-C-T-C-G-A-T-G) (d = desoxy),

Fig. 1b ein Negativionen-FAB-Massenspektrum des Oligodesoxyribonukleotids b, nämlich d(G-C-G-A-T-C-G-C),

Fig. 1c ein Negativionen-FAB-Massenspektrum des Oligodesoxyribonukleotids c, nämlich d(G-A-A-G-A-T-C-T-T-C),

Fig. 2a ein vereinfachtes Strukturschema des Oligodesoxyribonukleotids a,

Fig. 2b ein vereinfachtes Strukturschema des Oligodesoxyribonukleotids b,

Fig. 2c ein vereinfachtes Strukturschema des Oligodesoxyribonukleotids c,

Fig. 3 ein vereinfachtes Strukturschema des Oligoribonukleotids d (G-A-U) sowie dessen Negativionen-FAB-Massenspektrum,

Fig. 4 ein vereinfachtes Strukturschema des Oligoribonukleotids d (A-A-A-A-A-A) sowie dessen Negativionen-FAB-Massenspektrum,

Fig. 5 ein vereinfachtes Strukturschema des Oligoribonukleotids d (A-A-A-A-A-A-A-A) sowie dessen Negativionen-FAB-Massenspektrum und

Fig. 6 ein vereinfachtes Strukturschema des Oligodesoxyribonukleotids d (G-A-T) sowie dessen Negativionen-FAB-Massenspektrum,

wobei bei den vereinfachten Strukturschemen der Figuren 2a bis 2c diejenigen Bindungen durch gestrichelte Linien markiert sind, deren Bruch zu den wesentlichen Fragmentationen führt; dabei wurde an den Bruchstellen jeweils die Masse dieser Fragmentationen angeführt, wobei die oben an einer gestrichelten Linie angegebene Masse dem 5'-P-Sequenzion und die unten an einer gestrichelten Linie angegebene Masse dem 3'-P-Sequenzion entspricht.

Wenn man reine Oligonukleotide in das erfindungsgemäße Verfahren einsetzt, erhält man praktisch nur spezifische 5'-P-Sequenzionen und 3'-P-Sequenzionen (vgl. Fig. 1a bis 1c). Diese ausschließliche Bildung spezifischer Sequenzionen ermöglicht eine rasche Sequenzanalyse allein dadurch, daß man die Massendifferenzen zwischen aufeinanderfolgenden Sequenzionen des gleichen Typs ermittelt. Eine Unterscheidung

zwischen diesen beiden Typen von Sequenzionen ist möglich, da Ionen unterschiedlichen Typs, jedoch mit der gleichen Anzahl von Nukleotideinheiten regelmäßig durch ihre Peakintensität zu unterscheiden sind. Da die Bindung mit dem 3'-O-Atom, das mit einem sekundären Kohlenstoffatom des Zuckeranteils verbunden ist, labiler ist als die Bindung mit dem 5'-O-Atom, das mit einem primären Kohlenstoffatom des Zuckeranteils verbunden ist, treten die 5'-P-Sequenzionen ohne Ausnahme intensiver als die entsprechenden 3'-P-Sequenzionen auf.

Zur Ermittlung der Nukleotidsequenz geht man folgendermaßen vor.

Beginnend vom $(M-H)^{-}$ -Peak ($(M-H)^{-}$ = Molekül minus Proton) klassifiziert man alle Sequenzionen entsprechend ihrer Intensität entweder als 5'-P-Ionen oder als 3'-P-Ionen. Für die Figuren 1a und 2a erhält man dabei folgendes Ergebnis:

Tabelle 1

5'-P-Sequenzionen

3'-P-Sequenzionen

2407 $/(M-H)^{-}$ -Ion/

2174	2158
1885	1854
1581	1541
1292	1212
963	923
650	619
346	330

Danach ermittelt man die genaue Massendifferenz zwischen benachbarten Peaks desselben Sequenzionentyps. Mit der folgenden Tabelle kann man den ermittelten Massendifferenzen das

Jeweilige Nukleotid zuordnen.

Tabelle 2

Nukleotid	Massendifferenz mittelständig (mit PO_4H)	Massendifferenz endständig (ohne PO_4H) (mit $\text{PO}_4\text{H} + \text{OH}$)
A	313	233 330
C	289	209 306
G	329	249 346
T	304	224 321

Den Figuren 2a bis 2c kann man entnehmen, daß man hinsichtlich der 5'-P-Sequenzen und der 3'-P-Sequenzen zwischen einem 5'-Ende (links in den Figuren) und einem 3'-Ende (rechts in den Figuren) unterscheiden kann, die den entgegengesetzten Enden des jeweiligen Oligodesoxyribonukleotids zugeordnet sind. Dementsprechend kann man die vollständige Basensequenz eines dem erfindungsgemäßen Verfahren unterworfenen Oligonukleotids zweimal ablesen, indem man entweder am 5'-Ende oder am 3'-Ende beginnt.

Diese Möglichkeit, die Basensequenz eines Oligonukleotids in zwei verschiedenen Richtungen abzulesen, bietet die Möglichkeit, daß man die Basensequenz nicht unbedingt in jeder Leserichtung vollständig ablesen muß, sondern nur bis zu bzw. ab einem Überlappungsbereich. Dieses Vorgehen kann dann vorteilhaft sein, wenn sich (beispielsweise infolge von Verunreinigungen des zu untersuchenden Oligonukleotids) die Massen der Sequenzen mit zunehmender Massenzahl weniger genau ermitteln lassen. In diesem Fall kann man eine vollständige Sequenzanalyse durch Zusammensetzen der in beiden Leserichtungen nur bis zum bzw. ab Überlappungsbereich für die kleineren Massenzahlen gewonnenen Ergebnisse ermitteln.

Es ist klar, daß alle Fragmente derselben Zusammensetzung dieselbe Masse unabhängig davon besitzen, ob es sich um 5'-P-Sequenzionen oder um 3'-P-Sequenzionen handelt. So zeigt das Spektrum der Sequenz b (Fig. 1b) nur einen Peak für beide endständigen Dinukleotidionen. Trotz dieses Umstands bietet die Ermittlung der Sequenz keinerlei Probleme. Aus dem Gesamtspektrum ist klar zu entnehmen, daß in einem weiten Massenbereich nur ein einziger Peak auftritt. Die Massen und die Peakintensitäten der höheren Oligonukleotidionen bestätigen klar, daß (gelesen vom 5'-Ende) die zweite Position C und die siebente Position G und der einzelne Peak der Masse 635 beide Dinukleotidionen repräsentiert.

Synthese der experimentell untersuchten Oligodesoxyribonukleotide

Im wesentlichen arbeitete man nach den bewährten Phosphotriestermethoden. Es wurden Benzoyl-, Anisoyl- und Isobutyryl-Gruppen zum Schutz der heterozyklischen Basen, 4-Methoxytrityl-Gruppen zum Schutz von 5'-OH und 2-Chlorphenyl- und 2,2,2-Tribromäthyl-Gruppen zum Schutz der Phosphatfunktionen verwendet. Die Kondensationsreaktionen wurden in Lösung mit 2,4,6-Triisopropylbenzolsulfonyl-3-nitro-1,2,4-triazolid als Kondensationsmittel durchgeführt. Schließlich bildete man die ungeschützten Oligomeren durch Behandeln mit Pyridin (10 %) in konzentriertem Ammoniak und danach durch Behandeln mit Essigsäure (80 %). Homogenitäten von mehr als 99 % wurden routinemäßig nach Ionenaustauschchromatographie (Sephadex A-25 in Gegenwart von 7 m Harnstoff) und nachfolgendes Entsalzen erhalten. Die Homogenität wurde sorgfältig durch Umkehrphasen-HPLC (Umkehrphasen-Hochdruckflüssigchromatographie), Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Gegenwart von Kettenlängen-Markierungen (11) und zweidimensionale Fingerprint-Methode überprüft.

Statt einer Ionenaustauschchromatographie in Gegenwart von Harnstoff oder Formamid kann man auch eine mehrfache Umkehrphasenchromatographie, eine Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen oder eine der vielen möglichen Kombinationen dieser Verfahren anwenden.

Herstellung der Massenspektrogramme der Fig. 1a bis 1c

Die Figuren 1a bis 1c zeigen die relevanten Regionen der Negativionen eines unter Beschuß mit schnellen Atomen durchgeführten Massenspektrogramms (FAB) von $a = d(A-C-T-C-G-A-T-G)$, $b = d(G-C-G-A-T-C-G-C)$ und $c = d(G-A-A-G-A-T-C-T-T-C)$ unter Ausschluß der Glycerinmatrix. Die Massendifferenz zwischen zwei Marken ist ein Indiz für das jeweilige Nukleotid. Die Massendifferenzen oberhalb der Spektren betreffen Fragmentationen mit 5'-Phosphatenden (5'-Phosphatsequenzen bzw. 5'-P-Sequenzen) und die Massendifferenzen unterhalb der Spektren betreffen Fragmentationen mit 3'-Phosphatenden (3'-Phosphatsequenzen bzw. 3'-P-Sequenzen). Die höchste Masse liefert das $(M-H)^-$ -Ion. Das entsprechende doppelt geladene Ion wurde bei der halben Masse gefunden. Die Spektren wurden mit einem Kratos MS 50 S mit einem Hochfeldmagneten (Massenbereich etwa 3000 bei 8 kV) und einer Kratos-FAB-Quelle aufgenommen. Die Atomkanone verwendete Xenon und lieferte einen Strahl neutraler Atome bei 8 bis 9 keV. Es wurde eine Lösung des Triäthylammoniumsalzes jedes Oligodesoxyribonukleotids (4 bis 5 μ l mit einem Gehalt entsprechend 1 bis 1,5 μ g; etwa 10 nmol) in die Glycerinmatrix (etwa 2 μ l) auf einem FAB-Kupferprobenträger injiziert. Das Wasser wurde über eine Schleuse (direct insertion lock) entfernt und die Spektren wurden bei einer Magnetauflösungsrate von 300 s/Dekade aufgezeichnet.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Sequenzanalyse von Oligoribonukleotiden ist in Tab. 3 und den Fig. 3 bis 5 erläutert.

1. Die Triethylammoniumsalze von Oligoribonukleotiden geben die zu den entsprechenden Oligodesoxyribonukleotiden analogen Massenpeaks (Beispiel: rA_6 , rA_8).

2. Die Analyse von gemischt-basigen Ribo-Tri- und Tetrameren zeigt, daß auch bei Oligoribonukleotiden die Ionen unterschiedlichen Typs jedoch mit der gleichen Anzahl von Nukleotideinheiten regelmäßig durch ihre Peakintensität zu unterscheiden sind (Beispiel: $d(G-A-T)$ und $r(G-A-U)$, wobei zu beachten ist, daß

Oligoribonukleotide üblicherweise das Nukleotid Uridin (U) statt Thymidin (T) enthalten (vgl. Fig. 3 und 6).

Das Verfahren ist analog auch auf chemisch modifizierte Oligomere anwendbar, wobei entweder im zu untersuchenden Material mindestens eine Phosphatladung vorhanden sein muß (vgl. Tab. 4 und 5), oder eine solche unter den Meßbedingungen erzeugt werden kann. Letzteres ist der Fall bei Phosphatschutzgruppen, die reduktiv abspaltbar sind (Beispiel: Tribromethyl- oder Cyanoethyl-Schutzgruppe).

Eine besondere Bedeutung dieser Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens liegt in der Möglichkeit, Zwischenstufen für die Oligonukleotidsynthese auf ihre Identität zu untersuchen. Es werden heutzutage meist teilgeschützte Mono- und Dinukleotide für die Synthese verwendet. Letztere entzogen sich bislang einer massenspektrometrischen Sequenzanalyse. Die Ergebnisse des erfindungsgemäßen Verfahrens sind in Tabelle 4 zusammengefaßt. Die charakteristischen Sets von Peaks ermöglichen eine eindeutige Sequenzaussage für Dinukleotide.

Tab. 3: Sequenz-Ionen von Oligoribonukleotiden

Nucleosid	C	U	A	G
erstes Fragment (Nukleosid + PO_3)	322	323	346	362
Folgefibrimente (Nukleosid + $\text{PO}_2\text{-H}$)	305	306	329	345
letztes Fragment (Nukleosid - OH)	225	226	249	265

Tab. 4: Geschützter Dideoxyribonukleotid-Typ:

DMTr - dX - pOcp - dY - pOcp - O -
 X : Abz, Cbz, G1b, T
 Y : Abz, Cbz, G1b, T

DMTr - Dimethoxytrityl
 ocp - o-Chlorphenyl
 X, Y - Nukleosid
 bz - Benzoyl
 1b - 1-Butyryl
 p - Phosphatrest

X \ Y	A	C	G	T
A	M 1373 pAp 734 Ap 544 DMTrAp 846	M 1349 pCp 710 Cp 520 DMTrAp 846	M 1355 pGp 716 Gp 526 DMTrAp 846	M 1260 pTp 621 Tp 431 DMTrAp 846
C	M 1349 pAp 734 Ap 544 DMTrCp 822	M 1325 pCp 710 Cp 520 DMTrCp 822	M 1331 pGp 716 Gp 526 DMTrCp 822	M 1236 pTp 621 Tp 431 DMTrCp 822
G	M 1355 pAp 734 Ap 544 DMTrGp 828	M 1331 pCp 710 Cp 520 DMTrGp 828	M 1337 pGp 716 Gp 526 DMTrGp 828	M 1242 pTp 621 Tp 431 DMTrGp 828
T	M 1260 pAp 734 Ap 544 DMTrTp 733	M 1236 pCp 710 Cp 520 DMTrTp 733	M 1242 pGp 716 Gp 526 DMTrTp 733	M 1147 pTp 621 Tp 431 DMTrTp 733

Tab. 5: Sequenz-Ionen von 5'--(NMTR)--Oligodeoxyribonucleotiden; NMTR = Monomethoxytrityl

Nucleosid	C	T	A	G
erstes Fragment 3'--P	578	593	602	618
erstes Fragment 5'--P	306	321	330	346
Folgefragmente	289	304	313	329
letztes Fragment 3'--P	209	224	233	249
letztes Fragment 5'--P	481	496	505	521

BOETERS, BAUER & PARTNER
PATENTANWÄLTE
EUROPEAN PATENT ATTORNEYS
THOMAS-WIMMER-RING 14
D-8000 MÜNCHEN 22

0103677

PA. BOETERS, BAUER & PARTNER
THOMAS-WIMMER-RING 14, D-8000 MÜNCHEN 22

Europäisches Patentamt

8000 München 2

DIPL.-CHEM. DR. HANS D. BOETERS
DIPL.-ING. ROBERT BAUER
MÜNCHEN

DIPL.-ING. VINCENZ v. RAFFAY
DIPL.-CHEM. DR. THOMAS FLECK
HAMBURG

TELEFON: (089) 22 78 87
TELEX: 5 24 878 mm
TELEGRAMME: PROVENTION, MÜNCHEN

Anmelderin: Gesellschaft für Biotechnologische
Forschung mbH (GBF), Mascheroder Weg 1,
D-3300 Braunschweig-Stöckheim

Patentansprüche

1. Verfahren zur Sequenzanalyse eines gegebenenfalls modifizierten Oligoribonukleotids oder Oligodesoxyribonukleotids, dadurch gekennzeichnet, daß man
(a) das gegebenenfalls modifizierte Nukleotid einer Massenspektrometrie unterwirft, wobei es sich bei dem modifizierten Nukleotid um ein Nukleotid mit mindestens einem ionischen Phosphatrest (Phosphatladung) oder um ein unter Meßbedingungen einen derartigen Phosphatrest lieferndes Nukleotid handelt,
(b) die Negativionen registriert und
(c1) die Massendifferenz zwischen gewichtsmäßig aufeinanderfolgenden 5'-P-Ionen und/oder
(c2) die Massendifferenz zwischen gewichtsmäßig aufeinanderfolgenden 3'-P-Ionen ermittelt und
(d) die ermittelten aufeinanderfolgenden Massendifferenzen den Basen zuordnet.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man das Nukleotid einer FAB-Massenspektrometrie

unterwirft.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch g e k e n n -
z e i c h n e t , daß man ein Nukleotid mit einer Homogeni-
tät von 95, insbesondere 97 und vorzugsweise 99 % verwendet.



FIG.2a

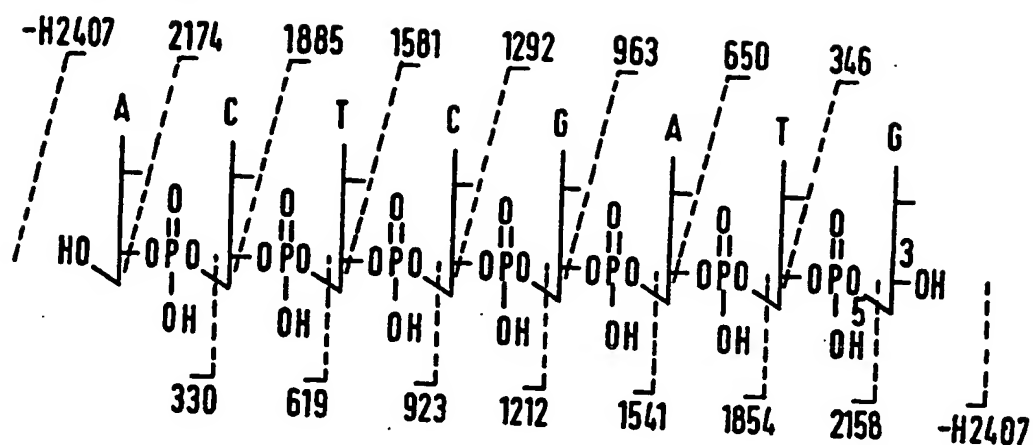


FIG.2b

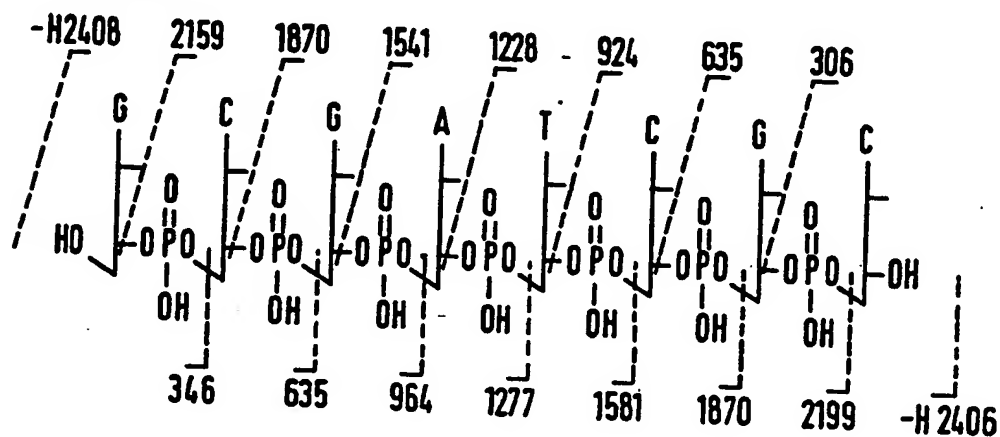
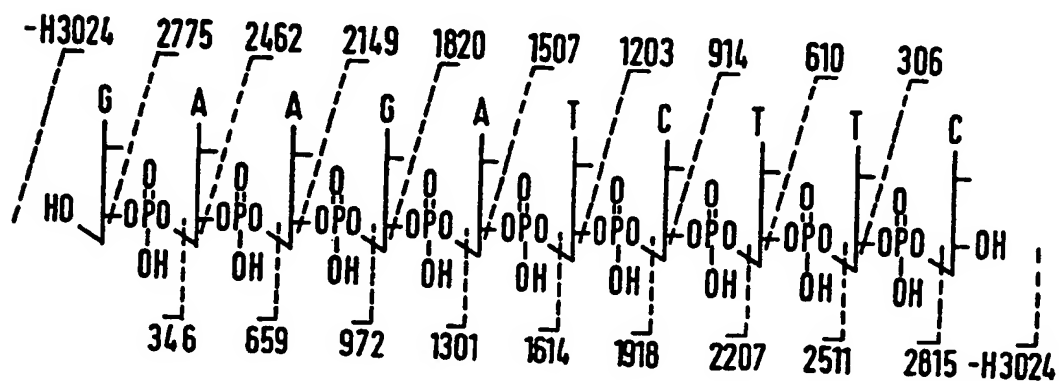


FIG.2c



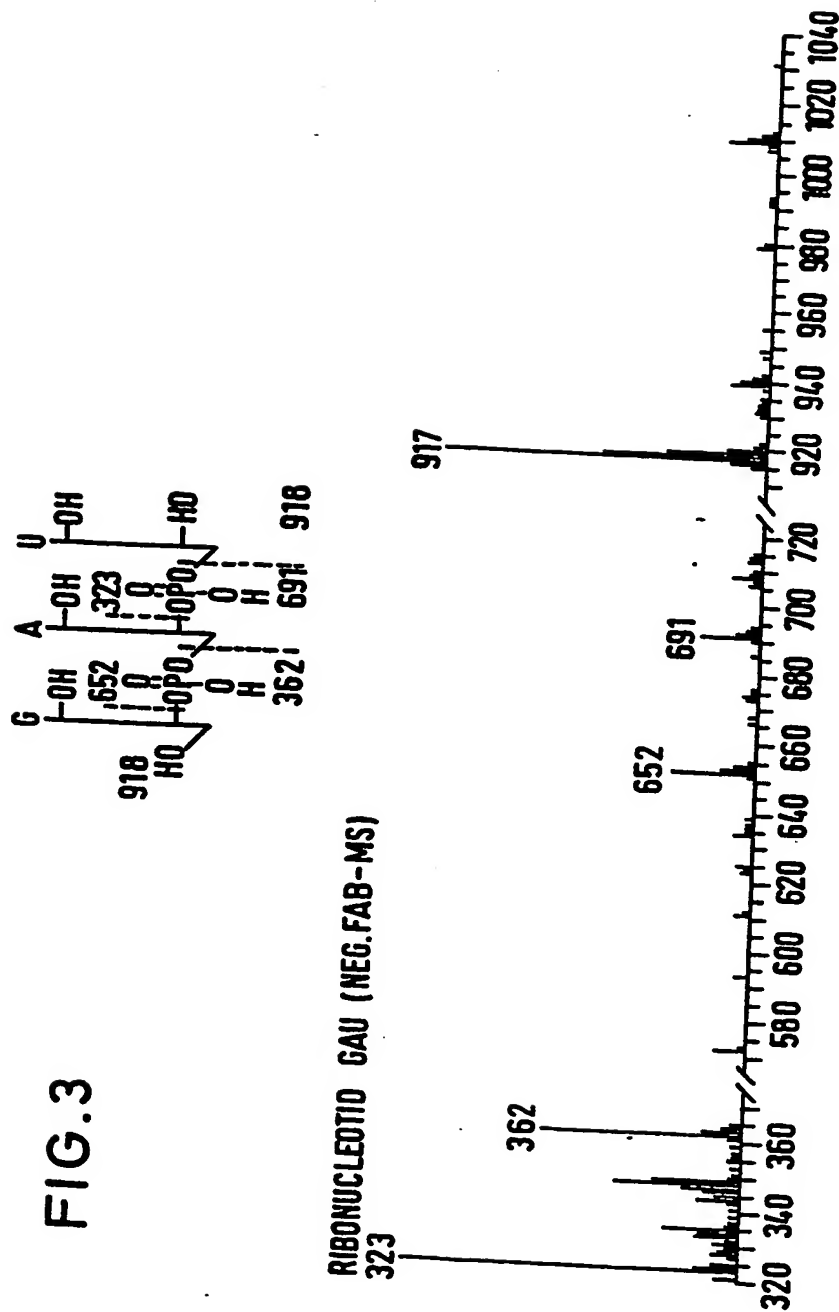


FIG. 4

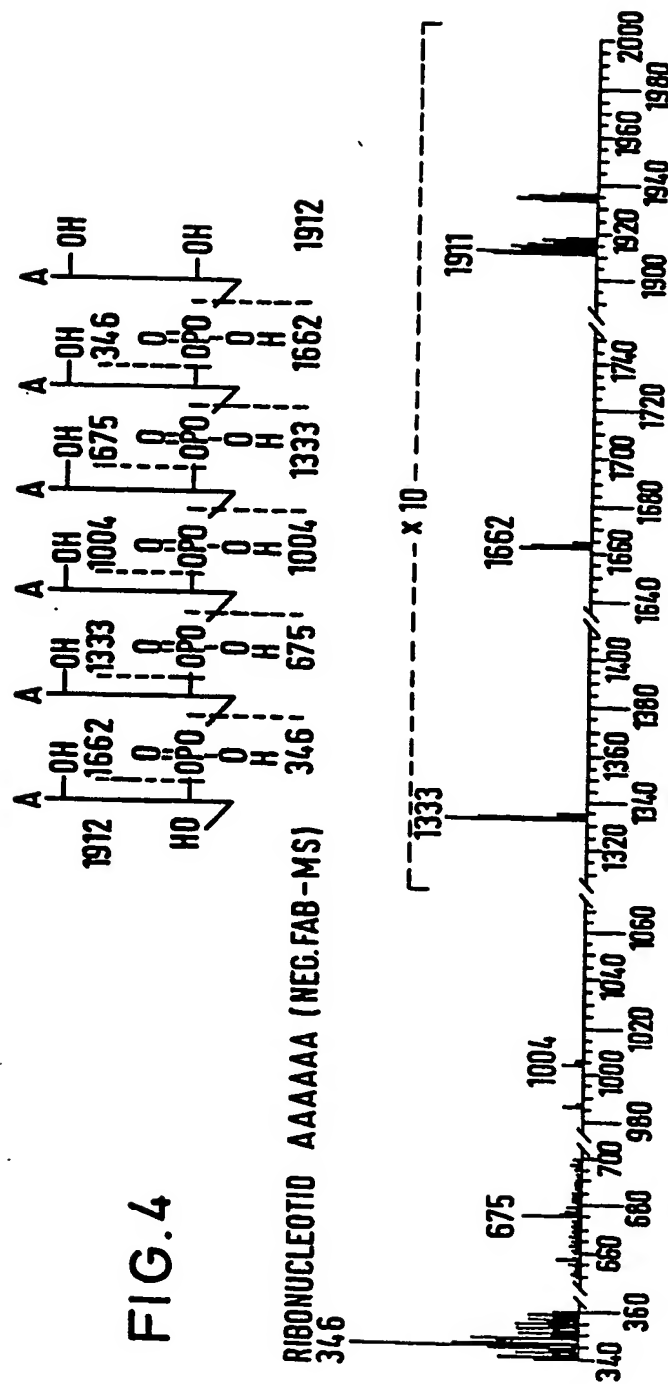
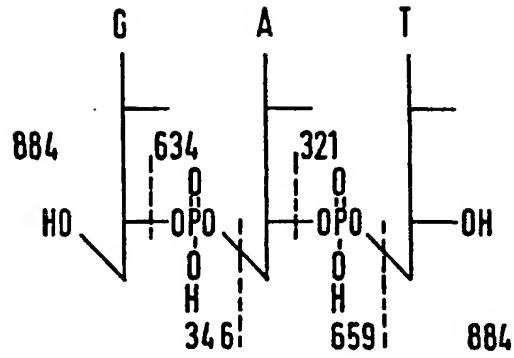


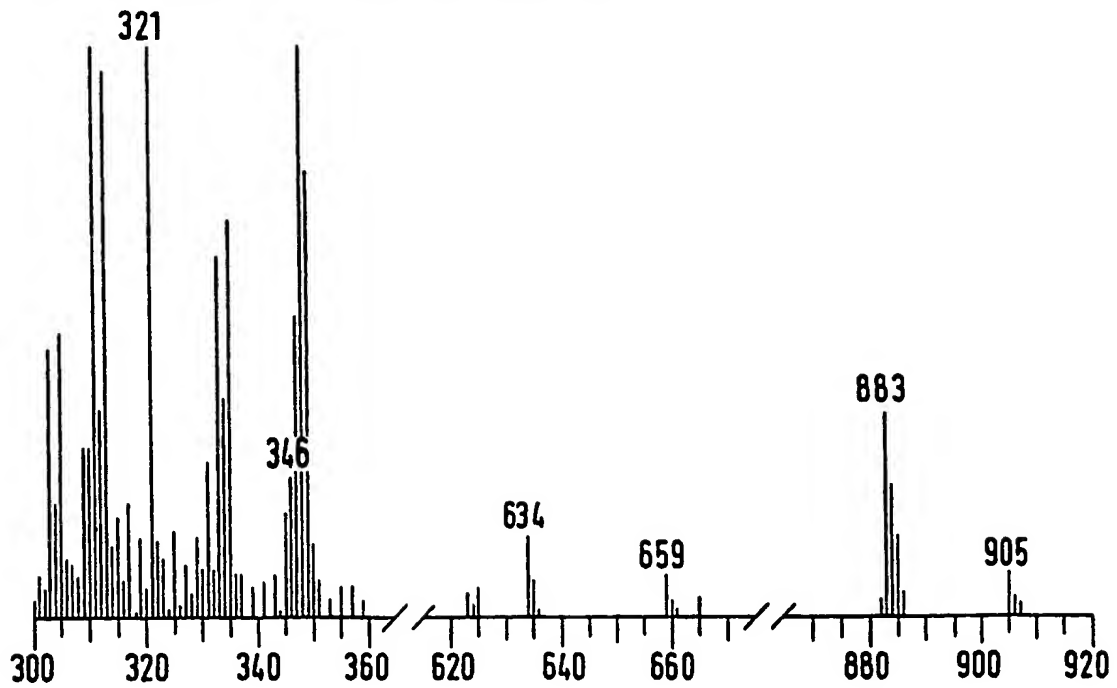
FIG. 5



FIG. 6



DESOXYRIBONUCLEOTID GAT (NEG. FAB-MS)



EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl. 7)
A	DE-A-2 241 513 (PURDUE RESEARCH FOUNDATION)		C 12 Q 1/68
A	--- NATURE, Band 274, Nr. 5666, 6. Juli 1978 J. STANLEY et al. "A different approach to RNA sequencing", Seiten 87-89		
A	--- Chemical Abstracts Band 96, Nr. 19, 10. Mai 1982, Columbus, Ohio, USA C. HIGNITE "Nucleic acids and derivatives [mass spectrometry]", Abstract Nr. 158397b & Biochem. Appl. Mass Spectrom (1st Suppl. Vol.), 1980, Seiten 527-566		
A	--- Chemical Abstracts Band 96, Nr. 19, 10. Mai 1982, Columbus, Ohio, USA W. ENS et al. "Secondary ion mass spectrometry of protected diribonucleoside monophosphates with a time-of-flight mass spectrometer", Seite 383, Spalte 2, Abstract Nr. 158572e & Anal. Chem., Band 54, Nr. 5, 1982, Seiten 960-966		
	--- -/-		
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl. 7) C 12 Q 1/68
Recherchenort BERLIN		Abschlußdatum der Recherche 06-09-1983	Prüfer SCHWARTZ K
<p>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN</p> <p>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet</p> <p>Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie</p> <p>A : technologischer Hintergrund</p> <p>O : mündliche Offenbarung</p> <p>P : Zwischenliteratur</p> <p>T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze</p> <p>E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>D : in der Anmeldung angeführtes Dokument</p> <p>L : aus andern Gründen angeführtes Dokument</p> <p>& : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</p>			



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

0103677

Nummer der Anmeldung

EP 83 10 5453

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			Seite 2
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl. 7)
A	Chemical Abstracts Band 92, Nr. 21, 26. Mai 1980, Columbus, Ohio, USA C.J. McNEIL et al. "Sequence determination of protected oligodeoxyribonucleotides containing phosphotriester linkages by californium-252 plasma desorption mass spectrometry", Seite 275, Spalte 2, Abstr. Nr. 176839u & Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Band 77, Nr. 2, 1980, Seiten 735-739 -----		
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl. 7)
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.			
Recherchenort BERLIN		Abschlußdatum der Recherche 06-09-1983	Prüfer SCHWARTZ K
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze			
E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument			